

На правах рукописи

САВАТЕЕВА
ЕКАТЕРИНА АНДРЕЕВНА

**ПРОИЗВОДНЫЕ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ – АНТИОКСИДАНТЫ
И БЛОКАТОРЫ НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ –
ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА**

03.01.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань, 2015

Работа выполнена в Химико-технологическом институте ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Научный руководитель:

академик РАН, доктор медицинских наук, профессор

Черешнев Валерий Александрович

кандидат медицинских наук

Емельянов Виктор Владимирович

Официальные оппоненты:

Цейликман Вадим Эдуардович – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», г. Челябинск

Шумаев Константин Борисович – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва

Ведущая организация:

ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, г. Москва

Защита диссертации состоится «24» сентября 2015 года в 13.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008 г. Казань, ул. К.Маркса, д.74, ауд.206. Телефон: 7(843)23-37-842.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» www.kpfu.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2015 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

Абрамова З.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Современная медицина испытывает потребность в новых лекарственных средствах для лечения сахарного диабета (СД) – распространенного социально значимого заболевания (Дедов И.И. Инновационные технологии в лечении и профилактике сахарного диабета и его осложнений // Сахарный диабет. 2013. № 3. С. 4 – 10). В поиске новых противодиабетических средств широко применяется экспериментальное моделирование заболевания на животных. С целью оптимизации данного этапа поиска противодиабетических средств необходимо четко представлять, на какие механизмы развития экспериментального и клинического СД способно повлиять новое соединение.

К числу потенциальных мишеней противодиабетических средств можно отнести два патохимических процесса, реализующихся в условиях хронической гипергликемии, – неферментативное гликозилирование белков (НГБ) и оксидативный стресс (Балаболкин М.И. Диабетология // М.: Медицина, 2000. 672 с.; Monnier V.M., Sell D.R. Prevention and repair of protein damage by the Maillard reaction *in vivo* // Rejuvenation Res. 2006. V. 9, № 2. P. 264 – 273; Aldini G., Vistoli G., Stefek M. et al. Molecular strategies to prevent, inhibit, and degrade advanced glycooxidation and advanced lipoxidation end products // Free Radical Research. 2013. V.47, (Suppl. 1). P. 93 – 137). НГБ – спонтанная химическая реакция между аминокетонами молекулы белка и карбонильными группами моносахаридов и последующие превращения образовавшегося соединения, протекающие без участия ферментов. Происходящие изменения нарушают ионные взаимодействия в белковой молекуле, изменяют конформацию, растворимость, а вследствие этого – функциональные свойства и чувствительность к действию протеаз. Так, показано, что инсулин, неферментативно гликозилированный *in vitro*, частично утрачивает способность снижать уровень глюкозы в крови и стимулировать транспорт глюкозы в клетки при введении животным (Hunter S. J., Boyd A. C., O'Harte F. P.M. et al. Demonstration of glycated insulin in human diabetic plasma and decreased biological activity assessed by euglycemic-hyperinsulinemic clamp technique in humans // Diabetes. 2003. V. 52. P. 492 – 498; McKillop A.M., Mooney M.H., Harriott P. et al. Evaluation of glycated insulin in diabetic animals using immunocytochemistry and radioimmunoassay // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. V. 286. P. 524 – 528).

Комплекс метаболических нарушений, характерных для СД, приводит к оксидативному стрессу – дисбалансу между про- и антиоксидантами, с накоплением продуктов свободнорадикального окисления (СРО) липидов, белков, нуклеиновых кислот (Evans J.L., Maddux B.A., Goldfine I.D. et al. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistances // Antioxid. Redox Signal. 2005. V. 7, № 7-8. P. 1040 – 1052; Меньщикова Н.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и соавт. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания // Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.; Шумаев К.Б., Губкина С.А., Кумскова Е.М. и соавт. Механизм образования супероксидного радикала при взаимодействии L-лизина с дикарбонильными соединениями // Биохимия. 2009. Т. 74, №4. С. 568 – 574). Имеются веские доказательства эффективности серосодержащего антиоксиданта и блокатора НГБ – липоевой кислоты (ЛК) – в терапии СД и его осложнений (Стаховская Л.В., Гусева О.И. α -липоевая кислота: фармакологические свойства и клиническое применение. Обзор литературы // М., РГМУ, 2003. 63 с.; Ziegler D., Tritschler H.-J., Strokov I.A., Ametov A.C. et al. Лечение диабетической полиневропатии тиоктовой кислотой (обзор литературы) // Фарматека. 2008. Т. 17, №171. С. 28 – 35; Shay K.P., Moreau R.F., Smith E.J. et al. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1790. P. 1149 – 1160). Однако остается открытым вопрос, можно ли улучшить результаты лечения СД путем применения синтетических серосодержащих соединений, обладающих свойствами антиоксидантов и блокаторов НГБ.

В связи с этим привлекают внимание синтетические серосодержащие соединения ряда 1,3,4-тиадиазина (1,3,4-ТД) и 2,4-замещенных тиазолов. Имеются сведения об антиоксидантной и радиозащитной активности представителей этих классов соединений (Pfeiffer W.-D.

1,3,4-Oxadiazines and 1,3,4-Thiadiazines // Compr. Heterocycl. Chemistry III. 2008. V. 9. P. 401 – 455; Расина Л.Н., Перова Н.М., Новикова А.П., Чупахин О.Н. Структура, поведение в организме и биологическая активность производных тиазола // Материалы Первой Международной конференции «Химия и биологическая активность азотистых гетероциклов и алкалоидов»; под ред. В.Г. Карцева и Г.А. Толстикова. – М., 2001. – Т. 2. – С. 246). Производные 2-аминотиазола и тиазолидиндиона обладают противодиабетической активностью (De S., Adhikari S., Tilak-Jain J. et al. Antioxidant activity of an aminothiazole compound: possible mechanisms // Chem. Biol. Interact. 2008. V. 173. P. 215 – 223; Спасов А.А., Петров В.И., Чепляева Н.И., Ленская К.В. и соавт. Фундаментальные основы поиска лекарственных средств для терапии сахарного диабета 2-го типа // Вестник РАМН. 2013. № 2. С. 43 – 49). Показано, что производные 1,3,4-ТД способны в водных растворах трансформироваться в тиольные производные, которые, согласно нашей гипотезе, могут связывать глюкозу и карбонильные интермедиаты НГБ, а также обладать антиоксидантными свойствами. Однако, противодиабетическая активность производных 1,3,4-ТД и 2,4-замещенных тиазолов ранее не изучалась. Вышеизложенное определило цель и задачи данной работы.

Целью настоящей работы является оценка способности производных серосодержащих гетероциклов проявлять антиоксидантную активность, блокировать НГБ и корректировать метаболические нарушения при экспериментальном СД.

Задачи:

1. Провести скрининг способности блокировать реакцию неферментативного гликозилирования бычьего сывороточного альбумина (БСА) глюкозой *in vitro* в рядах производных 1,3,4-ТД и 2,4-замещенных тиазолов.
2. Исследовать антиоксидантную активность производных 1,3,4-ТД на модели ингибирования окисления аскорбиновой кислоты (АК) кислородом воздуха.
3. Оценить соотношение липо- и гидрофильных свойств производных 1,3,4-ТД с антиоксидантной и противогликозилирующей активностью в системе «*n*-октанол – вода».
4. Изучить влияние производных 1,3,4-ТД и 2,4-замещенных тиазолов на биохимические показатели крови и внутренних органов крыс при аллоксановом СД.
5. Выяснить взаимосвязь между структурой, липофильностью, антиоксидантными, противогликозилирующими свойствами производных 1,3,4-ТД и их способностью корректировать метаболические нарушения при экспериментальном СД.
6. Провести кинетический анализ реакции НГБ и ее ингибирования восстановленным глутатионом (G-SH) на примере генноинженерного инсулина человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты РФФИ № 12-04-31852_мол_а и РФФИ-«Урал» № 10-04-96097) и «Программы развития УрФУ на 2010 – 2020 гг.».

Научная новизна. Впервые показано, что производные 1,3,4-ТД и 2,4-замещенных тиазолов способны ингибировать накопление продуктов НГБ при инкубации БСА с глюкозой. Установлено, что наилучшими противогликозилирующими свойствами обладают производные 5-фенил-1,3,4-ТД, имеющие кислородсодержащий гетерил- или алкиламиноновый заместитель в положении 2.

Произведена оценка липофильности потенциальных ингибиторов реакции НГБ - производных 1,3,4-ТД в системе «*n*-октанол – вода». Установлено, что коэффициент распределения $\lg K_{ow}$ для активных ингибиторов НГБ составлял 2,90 – 3,19, а для менее активных ингибиторов 3,14 – 4,02.

Впервые показана способность производных 1,3,4-ТД ингибировать окисление аскорбиновой кислоты кислородом воздуха. Наибольшую активность проявляют соединения Н-32, ТД-79, L-92, L-17, L-34.

Впервые на модели аллоксанового СД у крыс обнаружена противодиабетическая активность производных 1,3,4-ТД (L-17, L-14, Н-32, L-31, L-91) и 2-гуанидин-4-пиридинтиазола (2-Г-4-ПТ). Исследованные производные 1,3,4-ТД обладают способностью корректировать гипергликемию, накопление продуктов НГБ в крови и внутренних органах, а также обладают антиоксидантной активностью. 2-Г-4ПТ снижает накопление продуктов НГБ и СРО липидов в крови и внутренних органах, не влияя на уровень гликемии.

Предложена и экспериментально подтверждена кинетическая модель процесса неферментативного гликозилирования генноинженерного человеческого инсулина *in vitro*. Найдены константы скоростей прямой и обратной элементарных реакций в стадии 2, отношение констант скоростей прямой и обратной элементарных реакций в стадии 1, а также термодинамические константы равновесия обеих стадий.

Установлено, что в диапазоне физиологических концентраций природный тиол G-SH обладает дозозависимой способностью ингибировать гликозилирование инсулина глюкозой *in vitro*, проведен кинетический анализ процесса.

На защиту выносятся следующие положения:

Производные 1,3,4-ТД и 2,4-замещенных тиазолов способны блокировать реакцию НГБ. Наилучшими противогликозилирующими свойствами обладают производные 5-фенил-1,3,4-ТД, с кислородсодержащим гетерил- или алкиламиновым заместителем в положении 2, и имеющие коэффициент распределения lgK_{ow} в системе «*n*-октанол – вода» в пределах 2,90 – 3,19.

Производные 1,3,4-ТД способны ингибировать окисление аскорбиновой кислоты кислородом воздуха. Наибольшую активность проявляют производные 1,3,4-ТД, имеющие морфолиновый заместитель в положении 2 и тиофен, фенил или *n*-фторфенил в положении 5.

Антиоксидантные и противогликозилирующие свойства производных 1,3,4-ТД и 2,4-замещенных тиазолов позволяют частично корректировать метаболические нарушения при развитии аллоксанового СД у крыс.

В результате кинетического исследования реакции неферментативного гликозилирования генноинженерного инсулина человека (ГИЧ) и её ингибирования G-SH, предложена математическая модель этой реакции, проверено её соответствие результатам эксперимента *in vitro*, рассчитаны константы скоростей и константы равновесия стадий образования ФА в отсутствии и в присутствии G-SH.

Практическая значимость. В ходе скрининга были найдены вещества, способные снижать накопление первичного продукта реакции НГБ фруктозамина (ФА), ингибировать окисление АК кислородом воздуха. Выявлены некоторые аспекты зависимости «структура-активность», что позволит вести целенаправленный поиск и синтез веществ с противогликозилирующей и антиоксидантной активностью. Применение веществ, сочетающих свойства антиоксиданта и блокатора НГБ, представляется перспективным подходом к фармакологической коррекции СД в эксперименте.

Апробация работы и публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 3 – в журналах, входящих в перечень ВАК. Подана 1 заявка на изобретение, № 2014151103 (приоритет от 16.12.2014 г.). Результаты работы доложены (с опубликованием тезисов) на международных и Российских конференциях: Российской конференции «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии» (Челябинск, 2009); Ежегодной конференции «Фармация и общественное здоровье» (Екатеринбург, 2010); XX Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Екатеринбург, 2010); I Международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в

физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2010); Ежегодной конференции «Фармация и общественное здоровье» (Екатеринбург, 2011); Всероссийской научно-практической конференции биохимиков и специалистов по лабораторной медицине «Медицинская биохимия и клиническая лабораторная диагностика в аспекте модернизации системы научных исследований» (Омск, 2011); II Международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2011); IX Всероссийской конференции «Химия и медицина» с Молодёжной научной школой по органической химии (Уфа, 2013); I научно-практической конференции аспирантов и студентов России «Химия в федеральных университетах» (Екатеринбург, 2013); Российской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской биохимии и клинической лабораторной диагностики» (Казань, 2013); Уральском научном форуме «Современные проблемы органической химии» (Екатеринбург, 2014); II Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Саратов, 2014); Российском научном форуме на Урале «Актуальные вопросы фундаментальной медицины» (Екатеринбург, 2014).

Личный вклад автора. Автор принимал участие в планировании диссертационного исследования, проводил литературный поиск, непосредственно осуществлял эксперименты *in vitro*, проводил биохимические исследования крови и органов экспериментальных животных, проводил расчёты и экспериментальную проверку кинетической модели реакции гликозилирования. Материал, представленный в диссертации, собран, обработан и проанализирован лично автором.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 160 страницах. Диссертация включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы, список литературы. Работа содержит 25 таблиц и 39 рисунков. Список литературы включает 225 источников, в том числе 141 работу на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В литературном обзоре рассмотрены биохимические механизмы развития нарушений обмена веществ при СД, существующие подходы к их фармакологической коррекции, химия и биологическая активность природных и синтетических серосодержащих гетероциклических соединений классов 1,3,4-ТД и замещённых тиазолов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании были использованы производные 1,3,4-ТД и 2,4-замещённые производные тиазола, синтезированные на кафедре органической химии Химико-технологического института УрФУ (к.х.н. Сидорова Л.П., к.х.н. Перова Н.М., к.х.н. Цейтлер Т.А., к.х.н. Новикова А.П.) под руководством академика РАН О.Н. Чупахина. В качестве веществ сравнения использовали восстановленный и окисленный глутатион, аминоксидин (Sigma, США) и метформин («Глюкофаж», Nyscomed, Германия).

Способность исследуемых соединений блокировать протекание реакции НГБ оценивали по накоплению начального продукта НГБ ФА при инкубации БСА с глюкозой в присутствии производных 1,3,4-ТД и 2,4-замещённых тиазолов. В модельный водный раствор, содержащий БСА в концентрации 5 г/л и глюкозу в концентрации 20 ммоль/л, в качестве ингибиторов реакции НГБ были добавлены указанные выше вещества в концентрации 20 ммоль/л. Система инкубировалась при температуре 4°C, в качестве консерванта в раствор добавлялся *m*-крезол в концентрации 2,5 мг/мл. Через 1, 2, 4, 8 недель отбирали пробы для определения концентрации начального продукта гликозилирования ФА (Викторова Л.Н., Городецкий В.К.

Колориметрический метод определения неферментативно гликозилированного альбумина и гемоглобина // Лаб. дело. 1990. № 5. С. 15 – 18).

Антиоксидантную активность производных 1,3,4-ТД оценивали по влиянию на скорость окисления АК кислородом воздуха. Для этого растворяли в воде 1,3,4-ТД и АК в соотношениях 1:1 и 1:2 соответственно и инкубировали при температуре 37 °С и интенсивном перемешивании в течение 6 час. Каждый час отбирались пробы и устанавливалась концентрация АК в растворах титриметрическим методом с 2,6-дихлорфенолиндифенолом (Девис М., Остин Дж., Патридж Д. Витамин С. Химия и биохимия // М.: Мир, 1999. 176 с.). На основании полученных данных были построены графики снижения концентрации АК в присутствии каждого исследуемого вещества. Скорости снижения концентраций вычислялись по формуле $v = \Delta C / \Delta t$, где ΔC - изменение концентрации АК, Δt - время инкубации.

Для оценки соотношения гидро- и липофильных свойств производных 1,3,4-ТД определяли коэффициент распределения веществ в системе «*n*-октанол/вода» методом медленного перемешивания (ГОСТ 32291-2013). Коэффициент распределения веществ в системе «*n*-октанол/вода» (K_{ow}) представляет собой соотношение равновесных концентраций вещества, растворенного в двухфазной системе, состоящей из двух практически несмешивающихся растворителей. Результат приводили в виде десятичного логарифма ($\lg K_{ow}$) (Rutkowska E., Pajak K., Jóźwiak K. et al. Lipophilicity – methods of determination and its role in medicinal chemistry // Acta Pol. Pharm. 2013. V. 70, №1. P. 3 – 18).

Эксперимент по оценке влияния серосодержащих гетероциклических соединений на биохимические показатели крови и внутренних органов при экспериментальном СД проведен на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН (д.б.н. Данилова И.Г., к.б.н. Гетте И.Ф., м.н.с. Булавинцева Т.С, директор – академик РАН В.А. Черешнев). Аллоксановый СД моделировали на 50 белых беспородных крысах-самцах массой около 200-250 г. Животные содержались в условиях лабораторного вивария, где поддерживалась постоянная температура в пределах 22 – 25°С и естественная смена дня и ночи. Все животные имели свободный доступ к пище и воде. Ежедневно проводилась очистка клеток, дезинфекция – один раз в неделю. Все манипуляции с животными осуществлялись с соблюдением этических принципов и в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

СД моделировали путем трехкратного внутрибрюшинного введения аллоксана в суммарной дозе 300 мг/кг массы животного. Одновременно с индукцией СД вводили соединения L-17, L-14, H-32, L-31, L-91 и 2-гуанидин-4-пиридинтиазол, гидробромид, в дозе 40 мг/г массы животного внутримышечно с периодичностью 3 раза в неделю в течение 4 недель. Вещества предварительно растворяли в инъекционной воде. В качестве вещества сравнения использовали ЛК («Октолипен», Россия) в аналогичных дозах.

По окончании эксперимента в крови животных определяли концентрации глюкозы (глюкозооксидазным методом) и общего белка (биуретовым методом) (Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. // Минск: Беларусь, 2000. Т.1 495 с., Т.2 463 с.). Для характеристики активности процесса НГБ у животных определяли концентрацию ФА в плазме крови и гомогенатах печени и почки (Викторова Л.Н., Городецкий В.К. Колориметрический метод определения неферментативно гликозилированного альбумина и гемоглобина // Лаб. дело. 1990. № 5. С. 15 – 18) и HbA_{1c} крови методом колоночной хроматографии наборами «Диабет-тест» (ООО «Фосфосорб», Россия). Активность СРО липидов оценивали по концентрации МДА плазмы (Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии; под ред. В. Н. Ореховича. М., 1977. С. 66 – 68) и активности каталазы цельной крови (Бах А.Н., Зубкова С.А. К вопросу о каталазе // Сборник избранных трудов. Ленинград. 1937. С. 241 – 245).

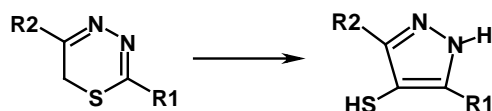
Кинетический анализ реакции неферментативного гликозилирования ГИЧ и его ингибирования G-SH проведён совместно с доцентом кафедры физической и коллоидной химии ХТИ УрФУ, к.х.н. Н.К. Булатовым.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Раздел 3.1. Противогликозилирующая и антиоксидантная активность производных 1,3,4-ТД

Раздел 3.1.1. Исследование способности производных 1,3,4-ТД блокировать реакцию неферментативного гликозилирования БСА глюкозой *in vitro*

Возможность применения природных и синтетических тиолов для коррекции НГБ *in vivo* ограничивает их низкая биодоступность и быстрая инаktivация при окислении до дисульфидов. В связи с этим очевидны перспективы исследования противогликозилирующей активности синтетических веществ, способных трансформироваться в тиольные производные в клетках. Такого рода трансформация характерна для производных 1,3,4-ТД, что может объяснять их широкий спектр биологической активности.



Среди 41 соединения, подвергнутого скринингу, нами было отобрано 12 наиболее активных веществ, подавлявших накопление ФА на 20 – 70% против контроля (рис. 1).

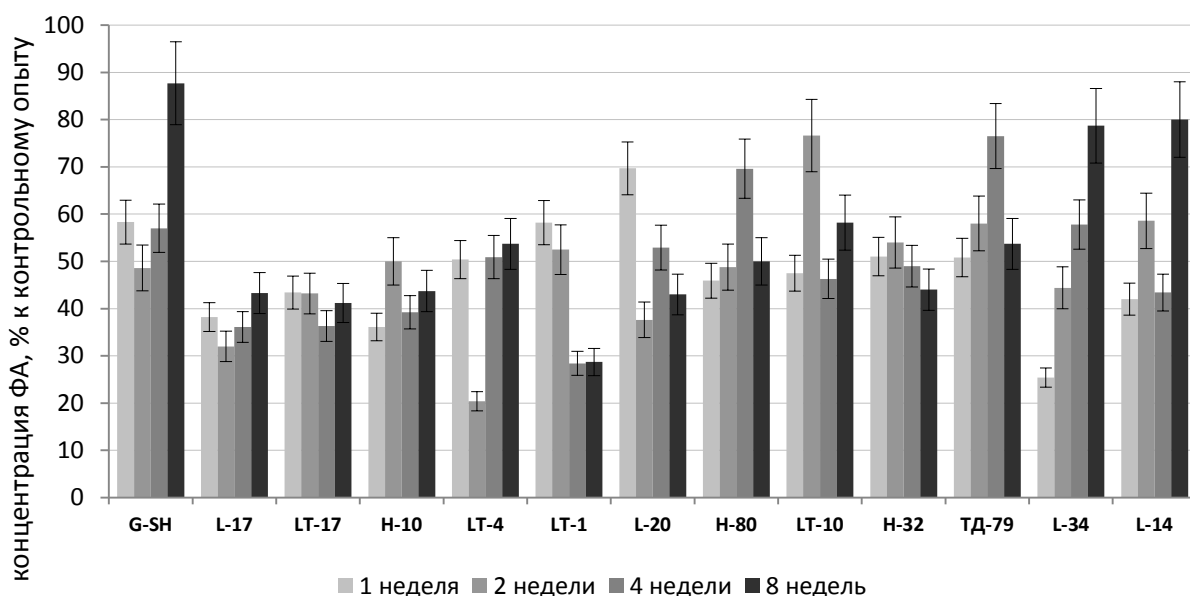
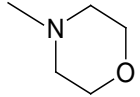
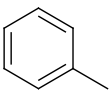
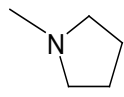
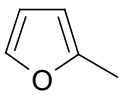
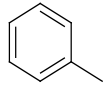
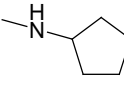
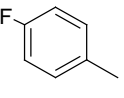
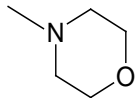
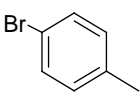
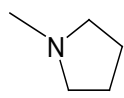
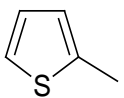
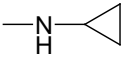
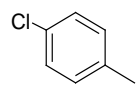
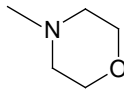
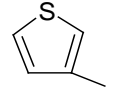
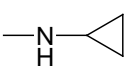
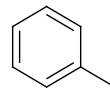
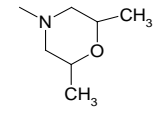
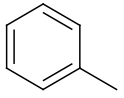
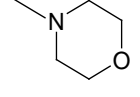
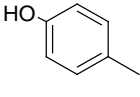

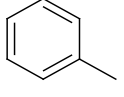


Рис. 1. Накопление ФА при инкубации БСА с глюкозой в присутствии производных 1,3,4-ТД, % к уровню контрольного опыта соответствующей недели эксперимента.
Вещество сравнения – G-SH.

Действие данных веществ проявлялось на всём протяжении эксперимента, в отличие от G-SH, утратившего активность к 8 неделям. Вещества, проявляющие максимальную противогликозилирующую активность, отличаются от малоактивных соединений по характеру заместителей в положениях 2 и 5 тиадiazинового цикла (табл. 1).

Таблица 1

Производные 1,3,4-тиадиазина, эффективно подавляющие накопление ФА

Обозначение соединения	Заместитель		Обозначение соединения	Заместитель	
	R ₁	R ₂		R ₁	R ₂
L-17			H-80		
LT-17	$\text{—NH—(CH}_2\text{)}_2\text{—OH}$		LT-10		
H-10			H-32		
LT-4			ТД-79		
LT-1			L-34		
L-20			L-14	$\text{—NH—(CH}_2\text{)}_3\text{—N—}$ 	

Среди активных ингибиторов типично сочетание фенила в положении 5, а в положении 2 - морфолина, либо иного кислородсодержащего алкиламинового фрагмента. Среди веществ с наименьшей противогликозилирующей активностью преобладают вещества, содержащие дихлортиофеновые заместители в положении 5, независимо от природы заместителя в положении 2.

Механизм противогликозилирующего действия соединений класса 1,3,4-ТД возможно связан с их способностью трансформироваться в SH-замещенные пиразолы, как это наблюдается при нагревании некоторых 1,3,4-ТД в кислых и щелочных средах, или присоединять глюкозу к фрагменту тиадиазинового кольца после его раскрытия (рис. 3). Можно предположить, что наличие в алкиламиновом фрагменте в положении 2 атома кислорода снижает электронодонорные свойства азота, участвующего в p-π сопряжении с тиадиазиновым циклом, тем самым способствует раскрытию цикла с разрывом связи сера-углерод.

Раздел 3.1.2. Исследование антиоксидантных свойств производных 1,3,4-ТД на модели окисления аскорбиновой кислоты кислородом воздуха

АК проявляет антиоксидантные свойства синергично с другими природными антиоксидантами. Известно, что аскорбат восстанавливает феноксидный радикал витамина Е, окисляясь при этом до дегидроаскорбата, а тиоловые соединения восстанавливают последний до АК. Содержание аскорбата в крови больных СД снижено и отрицательно коррелирует с уровнем HbA_{1c} (Kositsawat J., Freeman V.L. Vitamin C and A_{1c} relationship in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2006 // J. Am. Coll. Nutr. 2011. V. 30, № 6. P. 477 – 483).

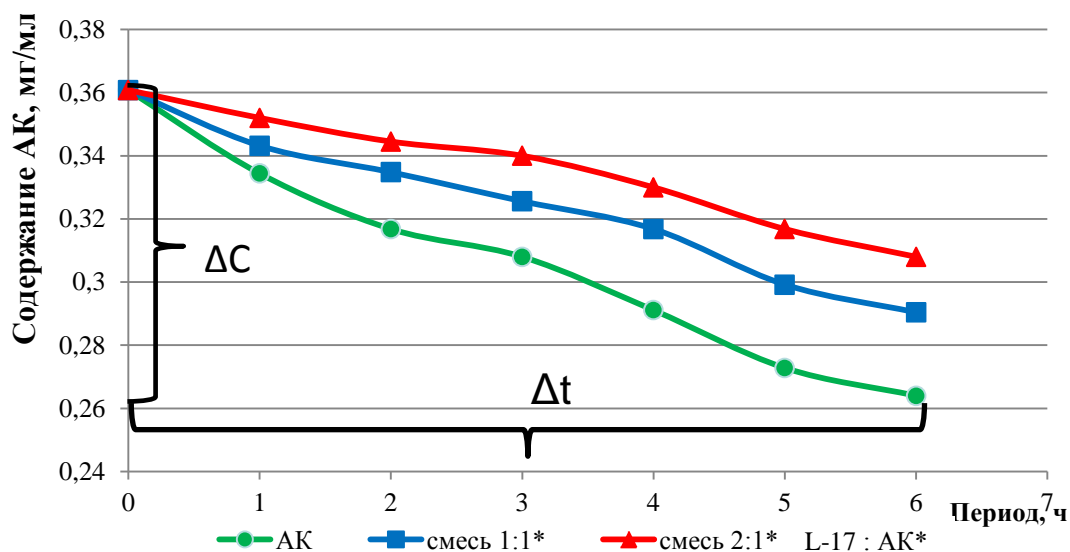


Рис. 2. Оценка влияния соединения L-17 на кинетику окисления АК кислородом воздуха.

Для оценки антиоксидантных свойств производных 1,3,4-ТД оценивали их способность ингибировать окисление АК кислородом воздуха. На примере вещества L-17, (рис. 2), видно, что концентрация АК в исследуемых растворах с течением времени уменьшается, но окисление АК кислородом воздуха в контроле идет быстрее, чем в присутствии вещества L-17. Скорость убыли АК без ингибитора составила 15,0 мкг/л·час, в присутствии эквимольного количества L-17 она снижалась до 11,5 мкг/л·час, а при 2-кратном избытке L-17 – до 8,5 мкг/л·час. В проведенном эксперименте показано, что вещество L-17 обладает дозозависимой способностью предотвращать окисление АК.

Эксперимент был проведен ещё с семью представителями класса 1,3,4-ТД, ЛК и глутатионом в окисленной и восстановленной формах. По полученным данным вычислены скорости снижения концентраций АК в исследованных растворах (табл. 2).

Таблица 2

Скорость окисления АК кислородом воздуха в присутствии серосодержащих соединений

В-во	1:1		1:2	
	v, мг/л·час	% К	v, мг/л·час	% К
GSH	9,78±0,49	50±2,5	2,44±0,12	57±2,8
GSSG	16,56±0,83	72±3,6	14,67±0,73	72±3,6
ЛК	29,33±1,47	86±4,3	29,33±1,46	86±4,3
ТД-79	6,98±0,35	17±0,8	10,48±0,52	30±1,5
L-92	18,33±0,92	78±3,9	10,86±0,54	44±2,2
H-32	16,10±0,81	62±3,1	7,33±0,37	28±1,4
L-31	25,88±1,29	75±3,7	32,59±1,63	100±5
L-34	39,01±1,95	100±5	23,33±1,16	56±2,8
L-17	28,62±1,43	72±3,6	21,46±1,07	53±2,6
LT-1	33,17±1,66	130±6,5	36,67±1,83	123±6,1
L-14	73,33±3,67	650±32,5	71,90±3,59	625±31,2

*% К – процент к уровню контрольного опыта

По приведённым в таблице данным можно сделать выводы о том, что наибольшей антиоксидантной активностью обладает вещество ТД-79, несколько слабее препятствуют

окислению АК G-SH, соединения Н-32, L-92, и L-17. Вещества L-34 и L-31, а также окисленный глутатион в двух исследованных концентрациях оказали неоднозначное влияние на кинетику окисления АК, а вещества LT-1 и L-14 и вовсе ускоряли его.

Возможный механизм данного эффекта 1,3,4-ТД мы связываем с действием продуктов его трансформации, содержащих тиольную группу. Эти соединения восстанавливают дегидроаскорбиновую кислоту до АК, сами при этом окисляясь до дисульфидов (рис. 3).

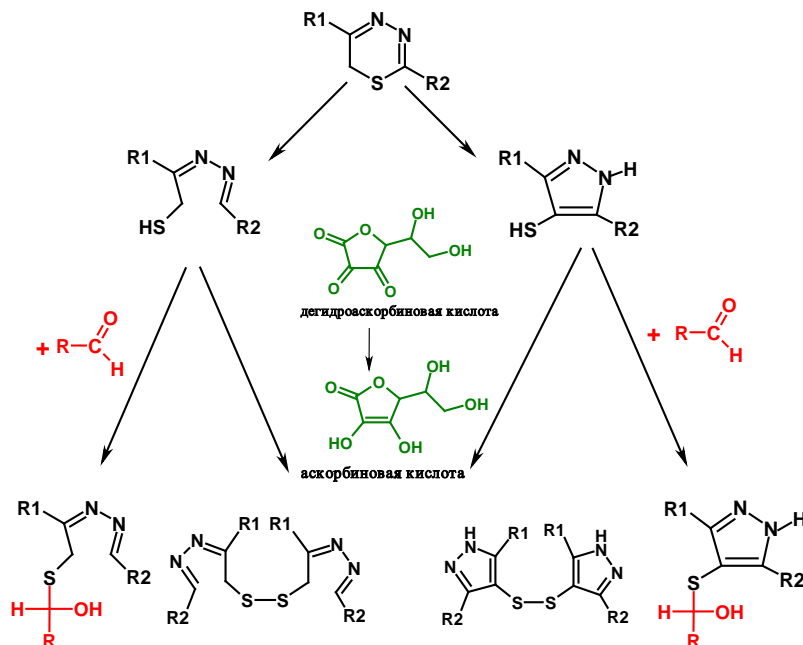


Рис. 3. Связывание карбонильных соединений и восстановление дегидроаскорбиновой кислоты в присутствии производных 1,3,4-ТД.

Анализ взаимосвязи «структура-активность» в ряду производных 1,3,4-ТД, изменяющих кинетику окисления АК кислородом воздуха, показывает зависимость данной активности от наличия и природы заместителей в положении 2 и 5 тиadiaзинового цикла. Так, среди производных 1,3,4-ТД, содержащих фенильный фрагмент в положении 5, наибольшей антиоксидантной активностью обладают соединения L-17 и L-34, содержащие в положении 2 морфолин и диметилморфолин, соответственно. С другой стороны, среди морфолинозамещённых производных 1,3,4-ТД наивысшими антиоксидантными свойствами обладают производные тиофена в положении 5. Наивысшей антиоксидантной активностью среди исследованных синтетических соединений обладал 2-морфолино-5-тиенил-1,3,4-ТД (ТД-79).

Раздел 3.1.3. Исследование соотношения липо- и гидрофильных свойств производных 1,3,4-ТД с антиоксидантной и противогликозилирующей активностью в системе «*n*-октанол – вода»

Взаимодействие между биологически активными веществами и клеточными и субклеточными структурами происходит в водной среде или в неводных слоях мембран, которые образованы гидрофобными фрагментами липидов. Показано, что возрастание липофильности соотносится со снижением водорастворимости, повышением скорости проникновения через кожу, увеличением степени связывания с белками плазмы, материальной кумуляцией, что в значительной мере определяет биологическую активность соединений (Lu Y., Kim S., Park K. et al. *In vitro-in vivo* correlation: perspectives on model development // Int. J. Pharm. 2011. V. 418, №1. P. 142 – 148; ГОСТ 32291-2013).

Методом медленного перемешивания были определены коэффициенты $\lg K_{ow}$ 10 производных 1,3,4-ТД, отличавшихся по противогликозилирующей активности (табл. 3).

Таблица 3

Значения коэффициентов распределения в системе «*n*-октанол - вода»
производных 1,3,4-тиадиазина

Вещ-во	LT-17	LT-4	L-17	ТД-79	Н-94	L-34	Н-32	L-103	L-92	L-14
$\lg K_{ow}$	2,90	3,01	3,03	3,06	3,14	3,17	3,19	3,38	3,41	4,02

При анализе значений $\lg K_{ow}$ исследованных 1,3,4-ТД были обнаружены закономерные отличия в липофильности соединений, отличающихся природой заместителей в положении 2 и 5. Например, соединение 2-Г-5-Ф имеет наименее объемный заместитель в положении 2 из всех изученных соединений и обладает наименьшей липофильностью. Соединение L-17, отличающееся от 2-Г-5-Ф меньшей полярностью заместителя в положении 2, имеет более высокое значение коэффициента $\lg K_{ow}$. Соединение L-34, имеющее 2 дополнительных метил-радикала в структуре морфолинового фрагмента по сравнению с L-17, обладает и большей липофильностью. Наконец, соединение L-14, имеющее наиболее алифатический и наименее полярный заместитель в положении 2, закономерно обнаружило самое высокое значение $\lg K_{ow}$.

Распределение производных 1,3,4-ТД с различной антиоксидантной активностью по соотношению липо- и гидрофильных свойств не продемонстрировало зависимости между способностью ингибировать окисление АК кислородом воздуха и $\lg K_{ow}$. Значения $\lg K_{ow}$ у производных 1,3,4-ТД с наивысшей антиоксидантной активностью не отличались от таковых у слабых антиоксидантов.

При сопоставлении липофильности и противогликозилирующей активности 1,3,4-ТД были выявлены следующие факты. Коэффициент распределения $\lg K_{ow}$ для более активных ингибиторов НГБ составлял 2,90 – 3,19 (в среднем 3,04), а для менее активных ингибиторов 3,14 – 4,02 (в среднем 3,42). Таким образом, можно сделать заключение, что оптимальным для проявления противогликозилирующей активности производных 1,3,4-ТД является значение $\lg K_{ow} = 2,90 - 3,19$.

Раздел 3.2. Исследование способности блокировать реакцию неферментативного гликозилирования БСА глюкозой *in vitro* в рядах 2,4-замещенных тиазолов

В лечении сахарного диабета и его осложнений применяются синтетические производные тиазола (тиамин) и гуанидина (метформин) (Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. Лечение сахарного диабета и его осложнений. Руководство для врачей // М.: Медицина, 2005. 512 с.; Аметов А.С. Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения // М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 704 с.). Аминогуанидин является эталонным соединением при экспериментальной оценке способности веществ ингибировать НГБ. Однако гуанидинзамещенные производные тиазола не подвергались ранее исследованию на противодиабетическую активность, что и обусловило постановку задачи данного раздела работы.

Для исследования были выбраны вещества – производные тиазола, содержащие гуанидиновую, аминогруппу или морфолин в положении 2, а также арил или гетерил в положении 4 (табл. 4).

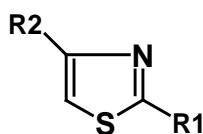


Таблица 4

Структура исследуемых 2,4-замещенных производных тиазола

Обозначение соединения	Заместитель		Обозначение соединения	Заместитель	
	R1	R2		R1	R2
2-гуанидин-4-фенилтиазол (2-Г-4-ФТ)			L-90		
2-гуанидин-4- <i>n</i> -аминофенилтиазол (2-Г-4-АФТ)			H-63		
2-гуанидин-4- α -пиридинтиазол (2-Г-4- α -ПТ)			H-107		
2-гуанидин-4- γ -пиридинтиазол (2-Г-4- γ -ПТ)			H-108		
2-гуанидин-4-(5-урацил)тиазол (2-Г-4-УТ)			H-109		

Строение этих веществ, в частности наличие гуанидиновой группы, делает их вероятными ингибиторами реакции НГБ за счет конкуренции с белком в реакции с глюкозой и карбонильными промежуточными продуктами. Кроме того, в эксперименте были использованы аминогуанидин (АМГ) и метформин (МФ), активность которых в качестве блокаторов реакции НГБ была доказана ранее (Ozyazgan S., Unlucerci Y., Bekpinar S., Akkan A.G. Impaired relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: effect of aminoguanidine (AMNG) treatment // Int. J. Exp. Diabetes Res. 2000. V. 1, №2. P. 145 – 153; Chang K.C., Hsu K.L., Chou T.F. et al. Aminoguanidine prevents age-related deterioration in left ventricular-arterial coupling in Fisher 344 rats // Br. J. Pharmacol. 2004. V. 142, № 7. P. 1099 – 1104; Ланкин В.З., Коновалова Г.Г., Тихазе А.К., Недосугова Л.В. Влияние природных дикарбониллов на активность антиоксидантных ферментов *in vitro* и *in vivo* // Биомед. хим. 2012. Т. 58, вып. 6. С. 727 – 736). Способность замещённых 2,4-тиазолов ингибировать реакцию НГБ исследовалась аналогично эксперименту с 1,3,4-ГД.

Из полученных данных (рис. 4) можно сделать вывод, что накопление ФА в модельной системе БСА с глюкозой в присутствии гуанидиновых производных тиазола снижается, по сравнению с контролем, более всего – в присутствии 2-гуанидин-4-фенилтиазола. В случае *n*-аминофенильного производного концентрация ФА превышала контрольную в 3,5 - 4 раза во всех сроках эксперимента. Мы связываем это со способностью данного соединения образовывать дополнительные количества ФА по аминогруппе аминофенильного фрагмента.

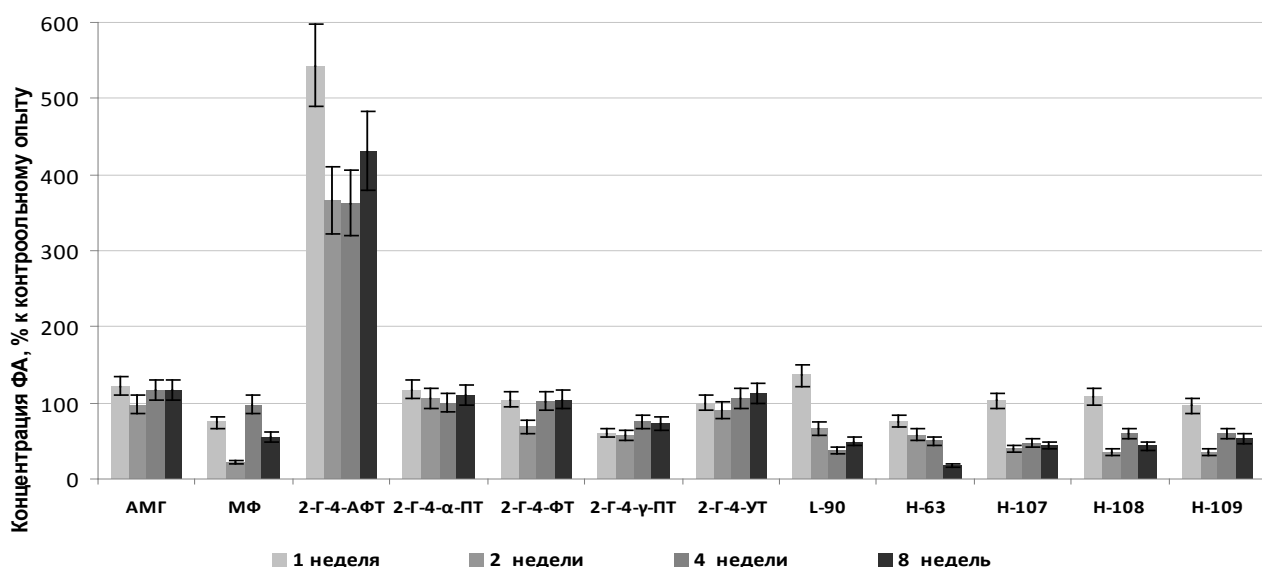


Рис. 4. Накопление ФА при инкубации БСА с глюкозой в присутствии 2,4-замещенных производных тиазола, % к уровню контрольного опыта соответствующей недели эксперимента. Вещества сравнения – аминоксантидин (АМГ) и метформин (МФ).

Значительную способность ингибировать накопление ФА в поздних сроках эксперимента демонстрировали производные тиазола, содержащие в положении-2 аминогруппу или морфолин, а в положении-4 фенил или замещенный фенил. Наивысшей активностью среди них обладал 2-морфолино-4-фенилтиазол (соединение Н-63). Таким образом, 4-арилтиазолы, содержащие в положении-2 гуанидиновую группу или морфолин, представляют собой перспективную в отношении поиска ингибиторов НГБ группу синтетических серосодержащих гетероциклических соединений.

Раздел 3.3. Биохимические показатели крови и органов крыс при развитии аллоксанового СД на фоне введения серосодержащих гетероциклических соединений

В разработке новых лекарственных средств для лечения СД широко применяется моделирование данной патологии в эксперименте на животных. Ведущую роль в формировании диабетического поражения сосудов и нервов играет вызванная длительной гипергликемией активация НГБ и СРО липидов, белков, нуклеиновых кислот. Известно, что природный тиол глутатион корректирует состояние эндокринной функции β -клеток поджелудочной железы при экспериментальном СД. В эксперименте и клинике получены многочисленные свидетельства успешной коррекции свободнорадикальных процессов и НГБ, усиления действия инсулина при СД введением ЛК. Учитывая ранее выявленную способность ряда гетероциклических соединений класса 1,3,4-ТД и 2-гуанидинтиазола ингибировать реакцию НГБ в модельной системе, представляет интерес оценить способность данных соединений влиять на биохимические показатели периферической крови при экспериментальном СД.

Таблица 5

Биохимические показатели крови и органов крыс при развитии аллоксанового сахарного диабета на фоне введения серосодержащих гетероциклических соединений, $M \pm m$

Показатель	Контроль (n=10)	Исследованное вещество						
		ЛК (n=7)	L-31 (n=5)	L-91 (n=5)	L-17 (n=7)	H-32 (n=5)	L-14 (n=5)	2-Г-4-ПТ (n=6)
Кровь								
Глюкоза, ммоль/л	34,6±3,4	14,8±1,7*	10,3±0,9*	13,7±1,9*	23,7±2,2*	25,2±5,2*	29,3±3,0*	33,4±2,5
HbA _{1c} , %	9,1±0,8	5,1±0,9*	6,9±0,3*	5,3±0,3*	6,5±0,7*	5,7±1,7*	7,5±0,7*	9,2±0,7
Фруктозамин, мкмоль/г белка	4,7±0,5	3,1±0,4*	3,8±0,5	3,6±0,2*	3,2±0,9	3,8±0,8	5,3±0,6	3,2±0,5*
Каталаза, нкатал/г Hb	156±11	1094±95*	1025±87*	1222±70*	143±8	79±9*	165±10	138±22
МДА, нмоль/л	441±19	370±50	365±45	303 ±43*	106 ± 27*	370±22	620±68	191±28*
Органы								
Фруктозамин, почка, мкмоль/г белка	45,2±3,8	16,3±1,3*	37,7±1,5	16,3±0,3*	15,6±2,2	23,9±2,0*	20,7±2,1*	17,3±0,9*
Фруктозамин, печень, мкмоль/г белка	20,9±8,0	3,7±0,3*	5,1±0,9*	9,3±0,8*	8,6±1,6*	9,4±1,3*	9,5±2,5*	8,3±1,2*

* - статистически значимые различия с контрольным опытом, $p < 0,05$

Согласно данным таблицы 5, введение аллоксана приводило к стойкой и выраженной гипергликемии, накоплению гликозилированных белков в крови и органах животных. Гипергликемия и активация НГБ могли служить триггером оксидативного стресса, накопления МДА и снижения активности каталазы крови. Введение ЛК существенно ослабляло, хотя и не отменяло полностью, биохимические нарушения при формирующемся аллоксановом СД. Гипергликемия и связанные с ней концентрации гликозилированных белков крови при введении ЛК были на 35-55% ниже, чем в контрольной группе. Содержание ФА в гомогенатах почек и печени при введении ЛК было в 2,8 и 5,6 раз, соответственно, ниже, чем в контроле. Антиоксидантный эффект ЛК в нашем исследовании проявился в увеличении активности каталазы, однако, содержание МДА в крови не претерпело статистически значимых изменений.

Исследованные синтетические серосодержащие гетероциклические соединения также обладали способностью частично корректировать метаболические нарушения при развитии аллоксанового СД. Однако в действии производных 1,3,4-ТД и 2-Г-4-ПТ имелись принципиальные различия. Производные 1,3,4-ТД L-17, L-91, H-32, L-14 вызывали снижение гипергликемии и концентрации HbA_{1c} в крови, а также ФА в почках и печени животных, подобно ЛК. Соединение L-31 отличалось от других 1,3,4-ТД тем, что не снижало накопления ФА в почках. Ключевым моментом корректирующего действия производных 1,3,4-ТД был антигипергликемический эффект.

Выраженность антигипергликемического эффекта производных 1,3,4-ТД в эксперименте *in vivo* убывала в ряду L-31 > L-91 > L-17 > H-32 > L-14. Анализируя взаимосвязь между активностью производных 1,3,4-ТД в эксперименте *in vivo* и *in vitro*, следует отметить, что соединения H-32, L-31 и L-17, активно ингибировавшие окисление АК кислородом воздуха, проявили большую корректирующую активность *in vivo*, чем соединение L-14, ускорявшее окисление АК в опыте *in vitro* и увеличивавшее накопление МДА в крови животных.

Введение 2-Г-4-ПТ не уменьшало выраженности гипергликемии и накопления HbA_{1c}, но статистически значимо снижало уровень МДА и ФА почек и печени. Таким образом, не обладая антигипергликемическим эффектом, 2-Г-4-ПТ проявлял свойства антиоксиданта и блокатора НГБ.

Способность ЛК и производных 1,3,4-ТД ослаблять метаболические нарушения при развивающемся аллоксановом СД мы связываем, прежде всего, с защитой β-клеток островков Лангерганса от индуцированного аллоксаном оксидативного стресса, приводящего к гибели панкреатических эндокриноцитов.

В качестве биохимического механизма такого влияния может рассматриваться способность ЛК и производных 1,3,4-ТД трансформироваться в тиольные производные, увеличивающие мощность антиоксидантной защиты β-клеток. 2-Г-4-ПТ, не обладая способностью пополнять фонд внутриклеточных тиолов, очевидно лишено прямого действия на β-клетки. Защитное действие данного соединения при развивающемся аллоксановом СД может быть объяснено с учетом данных об антиоксидантной активности замещенных тиазолов и способности гуанидиновых производных тиазола ингибировать НГБ путем реакции с глюкозой и карбонильными интермедиатами НГБ.

Таким образом, в проведенном исследовании впервые показана способность синтетических серосодержащих гетероциклических соединений ряда 1,3,4-ТД и 2-Г-4-ПТ корректировать метаболические нарушения при развитии аллоксанового СД у крыс. Метаболическое действие представителей двух классов серосодержащих гетероциклов отличалось: для производных 1,3,4-ТД был характерен антигипергликемический, антиоксидантный и противогликозилирующий эффекты, 2-Г-4-ПТ обладал только двумя последними механизмами действия. Эффективность производных 1,3,4-ТД в лечении экспериментального СД обнаруживала параллели с их антиоксидантной активностью *in vitro*.

Раздел 3.4. Кинетический анализ реакции неферментативного гликозилирования генноинженерного инсулина человека

НГБ представляет собой сложный многостадийный процесс, который условно можно разделить на три этапа. Начальный этап реакции НГБ включает 2 последовательные стадии (рис. 5).

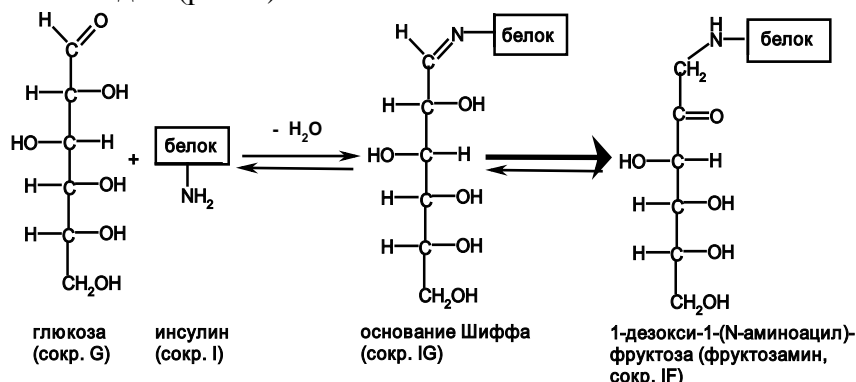


Рис. 5. Начальный этап реакции НГБ

Первая стадия – образование основания Шиффа, которое на второй стадии перегруппировывается в более стабильный продукт Амадори. В случае взаимодействия белка с глюкозой продукт Амадори имеет строение 1-дезоксиг-1-(N-аминоацил)фруктозы, (фруктозамин, ФА). В литературе имеются различные точки зрения в отношении обратимости 2-й стадии. Кинетический анализ в данной работе проведен в соответствии с гипотезой о том, что вторая стадия обратима.

Второй этап – превращение ФА в промежуточные продукты гликозилирования, карбонильные соединения: глиоксаль, метилглиоксаль и другие (рис. 6). Образовавшиеся карбонильные соединения более реакционноспособны в реакции с белком, чем исходный моносахарид.

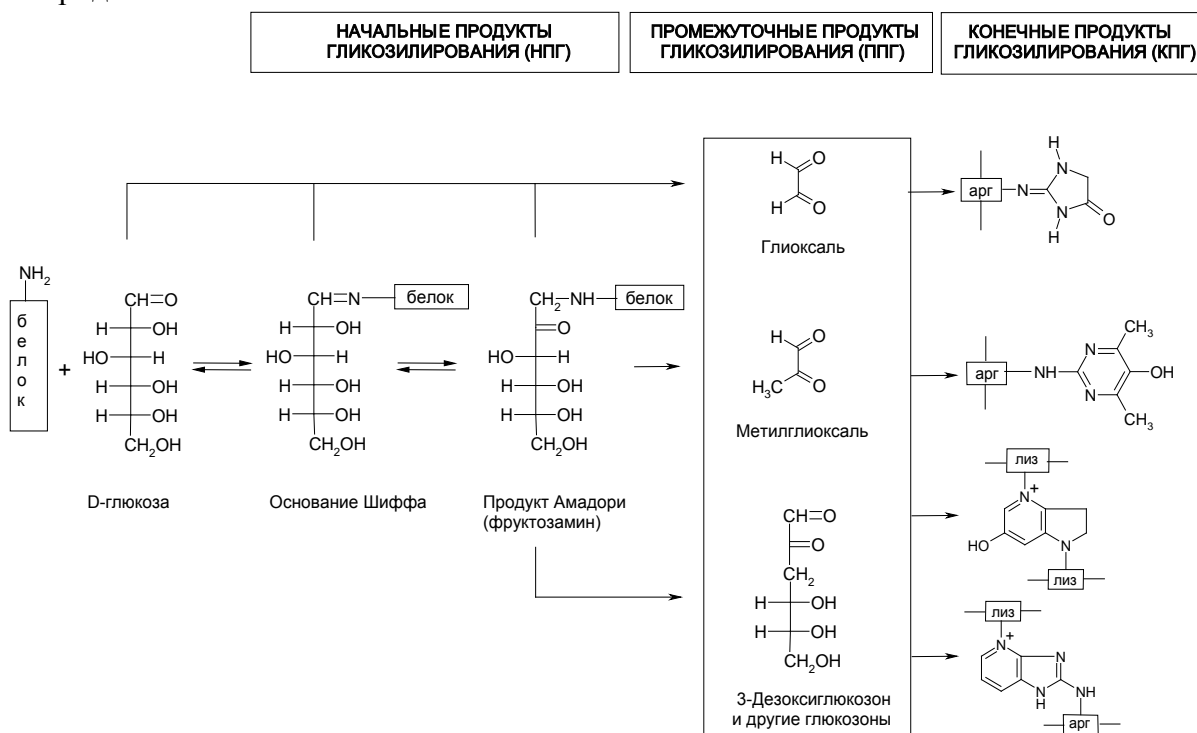


Рис. 6. Схема образования некоторых продуктов НГБ. Арг и лиз – остатки аргинина и лизина в составе белка.

Заключительный этап реакции – образование конечных продуктов гликозилирования за счет взаимодействия карбонильных соединений с молекулой белка (рис. 6). Образование конечных продуктов гликозилирования необратимо изменяет нативную структуру белков. Наиболее существенный вклад в этот процесс вносят внутри- и межмолекулярные сшивки между аминокгруппами белков.

Знание кинетических закономерностей гликозилирования инсулина позволит предложить механизм взаимодействия глюкозы с белком, что послужит основой выработки научного подхода к поиску и синтезу ингибиторов НГБ. Экспериментальное исследование кинетики неферментативного гликозилирования инсулина проводилось в модельных растворах, в состав которых входили ГИЧ и глюкоза в разных концентрациях. Растворы инкубировали в течение 8 недель, периодически отбирали пробы для определения концентрации фруктозамина.

Полученные данные по изменению концентрации c_{IF} в рабочих растворах с течением времени t представлены на рис. 7.

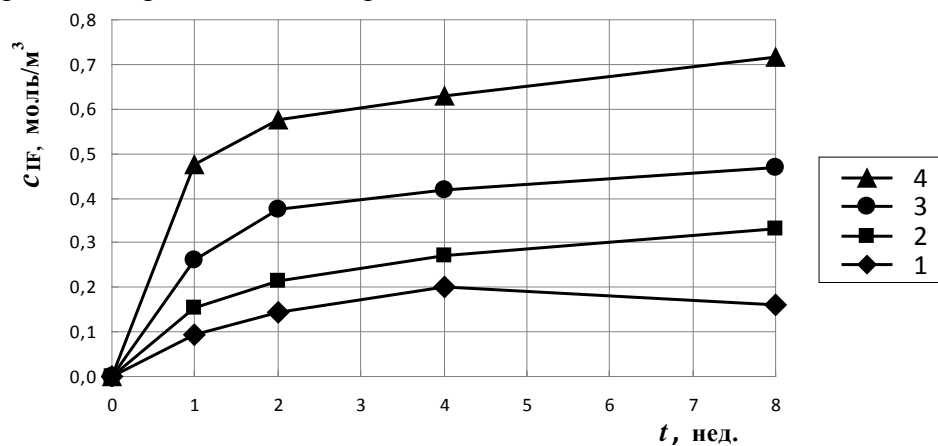


Рис. 7. Кинетические кривые $c_{IF}(t)_n$ ($n = 1, 2, 3, 4$) при $c_{H_2O,0} = 55400$ моль/м³, $c_{I,0} = 0,872$ моль/м³ и разных $C_{G,0}$, моль/м³: 1 – 6,25; 2 – 12,50; 3 – 25,00; 4 – 50,00. Температура $T = 277$ К.

Далее была проведена линеаризация кинетических кривых для последующей математической обработки (рис. 8), и выведена серия уравнений, характеризующих рассматриваемый этап реакции.

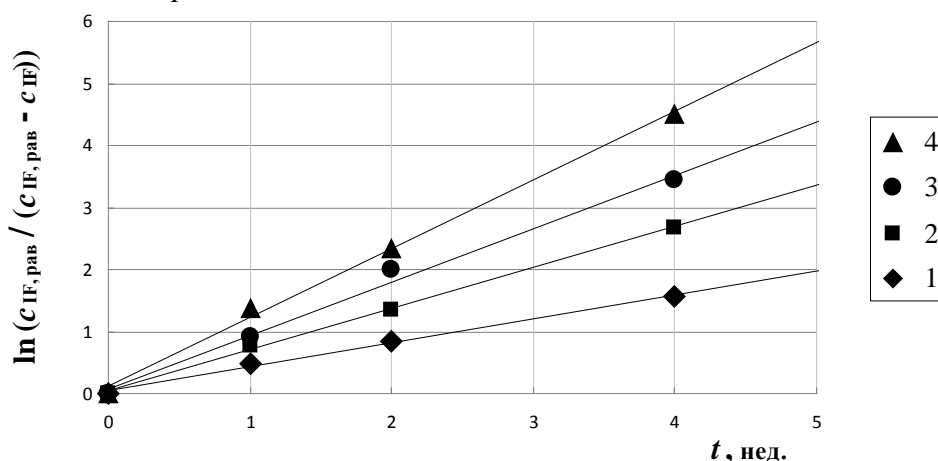
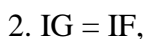
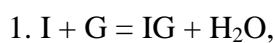


Рис. 8. Линейные образы кинетических кривых $c_{IF}(t)_n$ ($n = 1, 2, 3, 4$) в координатах t и $\ln(c_{IF,рав} / (c_{IF,рав} - c_{IF}))$ при следующем выборе $c_{IF,рав}$, моль/м³: 1 – 0,253; 2 – 0,290; 3 – 0,434; 4 – 0,637.

Путем обработки экспериментальных кривых $c_{IF}(t)$ с помощью кинетических уравнений процесса неферментативного гликозилирования ГИЧ *in vitro* найдены константы скоростей прямой и обратной элементарных реакций в стадии 2 ($k_2^{np} = 0,044715$ 1/час; $k_2^{обp} = 0,002158$ 1/час), отношение констант скоростей прямой и обратной элементарных реакций в стадии 1 ($k_1^{np}/k_1^{обp} = 134,2$), а также термодинамические константы равновесия обеих стадий ($K_1^c = 134,2$; $K_2^c = 21,0$). Определены равновесные концентрации всех инсулинсодержащих компонентов – участников процесса.

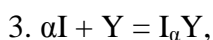
Данный процесс на начальном этапе его развития отчетливо проявляется в виде совокупности двух стадий, имеющих двусторонний характер, первая из которых представляет собой взаимодействие инсулина (I) с глюкозой (G) и ведет к образованию промежуточного соединения – основания Шиффа (IG), а вторая – к образованию фруктозамина (IF):



причем течение процесса происходит в квазиравновесном режиме по первой стадии.

Далее модельная система была усложнена добавлением третьего компонента реакции – G-SH, с целью выяснения его способности ингибировать реакцию НГБ. Аналогично предыдущему эксперименту, была проведена математическая обработка результатов эксперимента.

По результатам было установлено, что добавки G-SH не изменяют двухстадийный механизм данного процесса, протекающего в квазиравновесном режиме по стадии 1, но они существенно снижают его темп и степень продвижения за счёт связывания инсулина посредством глутатиона в химическое соединение типа $I\alpha Y$ по маршрутной реакции $p=3$:



где α – модуль стехиометрического коэффициента инсулина.

Показано, что в присутствии G-SH течение процесса гликозилирования инсулина на его начальном этапе происходит в квазиравновесном режиме не только по стадии 1, но и по маршрутной реакции 3, поэтому его ход во времени t по прежнему подчиняется интегральному кинетическому уравнению стадии 2, выраженному в логарифмической форме: $\ln(c_{IF, пав}/(c_{IF, пав} - c_{IF})) = at$, где параметры $c_{IF, пав}$ и a зависят от начальной концентрации глутатиона $c_{Y,0}$. Это означает, что G-SH способен дозозависимо снижать накопление ФА в модельной системе.

На основе расчётов по константе равновесия стадии 3 $K_3^c(T, [c_k])$ было установлено, что значение модуля стехиометрического коэффициента инсулина $\alpha = 4$. На практике это означает, что в модельной системе одна молекула глутатиона взаимодействует с четырьмя молекулами инсулина. Этот результат является довольно неожиданным из-за большого значения $\alpha=4$, поэтому он нуждается в дополнительном обсуждении с точки зрения механизма взаимодействия инсулина с G-SH. Вероятно, G-SH за счет имеющихся в его составе полярных функциональных групп способен нековалентно взаимодействовать с инсулином, за счет чего изменяется конформация белка. Также известно, что в растворе инсулин образует агрегаты – тетра и гексамеры. Диссоциация данных комплексов на мономеры может увеличивать доступность аминок групп для гликозилирования, поэтому замедление диссоциации в присутствии глутатиона способно ингибировать процесс.

Таким образом, в проведенном исследовании предложена и экспериментально подтверждена кинетическая модель процесса неферментативного гликозилирования генноинженерного человеческого инсулина *in vitro*. Установлено, что в диапазоне физиологических концентраций природный тиол G-SH обладает дозозависимой способностью ингибировать гликозилирование инсулина глюкозой *in vitro*, проведен кинетический анализ процесса.

Выводы:

1. Показано, что производные 1,3,4-тиадиазина и 2,4-замещенных тиазолов способны ингибировать накопление продуктов НГБ при инкубации бычьего сывороточного альбумина с глюкозой. Наилучшими противогликозилирующими свойствами обладают производные 5-фенил-1,3,4-тиадиазина, имеющие кислородсодержащий гетерил- или алкиламиноый заместитель в положении 2.

2. При оценке липофильности потенциальных ингибиторов реакции НГБ - производных 1,3,4-тиадиазина в системе «*n*-октанол – вода» установлено, что коэффициент распределения $\lg K_{ow}$ для активных ингибиторов НГБ составлял 2,90 – 3,19, а для менее активных ингибиторов 3,14 – 4,02.

3. Производные 1,3,4-тиадиазина обладают способностью ингибировать окисление аскорбиновой кислоты кислородом воздуха. Наибольшую активность проявляют соединения Н-32, ТД-79, L-92, L-17, L-34.

4. Производные 1,3,4-тиадиазина (L-17, L-14, Н-32, L-31, L-91) и 2-гуанидинтиазола корректируют метаболические нарушения при аллоксановом СД у крыс. Исследованные производные 1,3,4-тиадиазина снижают гипергликемию, накопление продуктов НГБ в крови и внутренних органах, а также обладают антиоксидантной активностью. 2-гуанидин-4-пиридинтиазол проявляет антиоксидантную и противогликозилирующую активность, не влияя на выраженность гипергликемии.

5. Серосодержащие гетероциклические соединения, производные 1,3,4-тиадиазина и 2,4-замещенных тиазолов, являются перспективными для дальнейшего исследования противодиабетической активности и ее биохимических механизмов в эксперименте на животных.

6. Отбор производных 1,3,4-тиадиазина для экспериментальной оценки противодиабетического действия *in vivo* может проводиться на основании результатов предварительного тестирования *in vitro* на противогликозилирующую активность (ингибирование накопления фруктозамина при инкубации бычьего сывороточного альбумина с глюкозой), антиоксидантные свойства (ингибирование окисления аскорбиновой кислоты кислородом воздуха) и соотношение липо- и гидрофильных свойств (в системе «*n*-октанол – вода»).

7. Предложена и экспериментально подтверждена кинетическая модель процесса неферментативного гликозилирования генноинженерного человеческого инсулина *in vitro* и его ингибирования G-SH, вычислен ряд констант данной реакции.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, определенных ВАК

1. Саватеева, Е.А. Кинетический анализ реакции неферментативного гликозилирования *in vitro* генноинженерного инсулина человека / Е.А. Саватеева, В.В. Емельянов, Н.К. Булатов, Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, В.А. Черешнев // Бутлеровские сообщения. – 2012. – Т.30, №6. – С.94 – 102.
2. Емельянов, В.В. Перспективы поиска новых противодиабетических средств среди серосодержащих гетероциклических соединений / В.В. Емельянов, Е.А. Саватеева,

- А.В. Мусальникова, Л.П. Сидорова, Н.М. Перова, А.П. Новикова, Т.С. Булавинцева, И.Ф. Гетте, И.Г. Данилова, Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, В.А. Черешнев // Аллергология и иммунология. – 2013. – Т. 14., № 2. – С. 141 – 142.
3. Булатов, Н.К. Кинетический анализ ингибирования глутатионом процесса неферментативного гликозилирования *in vitro* генноинженерного инсулина человека / Н.К. Булатов, Е.А. Саватеева, В.В. Емельянов, Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, В.А. Черешнев // Бутлеровские сообщения. – 2014. – Т. 38, № 5. – С. 103 – 111.

Другие публикации

1. Емельянов, В.В. Перспективы создания средств фармакологической блокады реакции неферментативного гликозилирования белка / В.В. Емельянов, Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, Я.А. Булгакова, Е.А. Саватеева, В.А. Черешнев // «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии» Российская конференция, посвященная 80-летию со дня рождения Р.И. Лифшица, приуроченная к 65-летию Челябинской государственной медицинской академии, 5 – 8 октября 2009 г.: сборник материалов конференции. Челябинск: ЧелГМА, 2009. – С. 91 – 92.
2. Емельянов, В.В. Влияние глутатиона на неферментативное гликозилирование инсулина *in vitro* / В.В. Емельянов, Е.А. Саватеева, Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, В.А. Черешнев // Материалы ежегодной конференции «Фармация и общественное здоровье», 25 февраля 2010 г. Сборник статей. – Екатеринбург: УГМА, 2010. – С. 27 – 30.
3. Булгакова, Я.А. Тиолы и производные гуанидина как потенциальные блокаторы реакции неферментативного гликозилирования белков / Я.А. Булгакова, Е.А. Саватеева // Тезисы докладов XIX Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии», посвященной 90-летию Уральского государственного университета им. А.М. Горького. Екатеринбург, 20-24 апреля. Екатеринбург: Издательство УрГУ, 2010. – С. 480-481
4. Саватеева, Е.А. Изменение собственной флюоресценции белков при неферментативном гликозилировании *in vitro* / Е.А. Саватеева, В.В. Емельянов, Я.А. Булгакова, Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, В.А. Черешнев // Материалы международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». Сборник статей. Санкт-Петербург, 23-26 ноября 2010 г. - СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2010. – С. 308 – 309.
5. Емельянов, В.В. Неферментативное гликозилирование белков крови и оксидативный стресс при аллоксановом сахарном диабете на фоне введения иммуномодуляторов / В.В. Емельянов, Е.А. Саватеева, Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, И.Г. Данилова, И.Ф. Гетте, В.А. Черешнев // Материалы ежегодной конференции «Фармация и общественное здоровье». Сборник статей. Екатеринбург, 19 мая 2011 г. – Екатеринбург: УГМА, 2011. – С. 383 – 385.
6. Емельянов, В.В. Гетероциклические соединения класса 1,3,4-тиадиазина – потенциальные блокаторы неферментативного гликозилирования белков / В.В. Емельянов, Е.А. Саватеева, А.В. Мусальникова, Е.А. Леонтьева, Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, Л.П. Сидорова, Н.М. Перова, В.А. Черешнев // Материалы Всероссийской научно-практической конференции биохимиков и специалистов по лабораторной медицине. Сборник статей. Омск, 20-21 сентября 2011 г. – Омск: ОмГМА, 2011. – С. 89 – 92.
7. Саватеева, Е.А. Ингибирование глутатионом неферментативного гликозилирования генноинженерного инсулина человека / Е.А. Саватеева, В.В.

- Емельянов, Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, В.А. Черешнев // Материалы международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». Сборник статей. Санкт-Петербург, 25-29 октября 2011 г. - СПб.: Изд-во Политехн. Ун-та, 2011. – С. 281 – 282.
8. Саватеева, Е.А. Серосодержащие гетероциклические соединения – блокаторы неферментативного гликозилирования белков / Е.А. Саватеева, В.В. Емельянов, А.В. Мусальникова, Л.П. Сидорова, Н.М. Перова, Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, В.А. Черешнев // Тезисы докладов IX Всероссийской конференции «Химия и медицина» с Молодёжной научной школой по органической химии, Уфа-Абзаково, 4-8 июня 2013 г. – Уфа: Изд-во БашГУ, 2013. – С. 101.
 9. Саватеева, Е.А. Серосодержащие гетероциклические соединения с потенциальной противодиабетической активностью / Е.А. Саватеева, В.В. Емельянов, А.В. Мусальникова, Л.П. Сидорова, Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, В.А. Черешнев // Материалы конференции «Химия в федеральных университетах». Сборник статей. Екатеринбург: УрФУ, 2013. – С. 142 – 144.
 10. Емельянов, В.В. Влияние серосодержащих антиоксидантов на развитие экспериментального сахарного диабета / В.В. Емельянов, Е.А. Саватеева, А.В. Мусальникова, Л.П. Сидорова, А.П. Новикова, Т.С. Булавинцева, И.Ф. Гетте, И.Г. Данилова, Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, В.А. Черешнев // Сборник научных статей Российской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской биохимии и клинической лабораторной диагностики», посвященной памяти академика АН РТ профессора Д.М. Зубаирова. Казань, 23-26 сентября 2013 г. – Казань: Издательство «Отечество», 2013. – С. 62 – 68.
 11. Емельянов, В.В. 1,3,4-Тиадиазины в экспериментальной терапии сахарного диабета / В.В. Емельянов, Е.А. Саватеева, Л.П. Сидорова, И.Ф. Гетте, Т.С. Булавинцева, И.Г. Данилова, Н.Н. Мочульская, О.Н. Чупахин, В.А. Черешнев // Уральский научный форум «Современные проблемы органической химии». Сборник тезисов. Екатеринбург, 8-12 июня 2014 г. – Екатеринбург: УрФУ, 2014. – С. 46.
 12. Емельянов, В.В. Синтетические блокаторы неферментативного гликозилирования белков для экспериментальной терапии сахарного диабета / В.В. Емельянов, Е.А. Саватеева, Л.П. Сидорова, Т.С. Булавинцева, И.Ф. Гетте, И.Г. Данилова, Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, В.А. Черешнев // Фундаментальная гликобиология: материалы конференции. II Всероссийская конференция. Саратов, 7-11 июля 2014. – Саратов: ООО «Ракурс», 2014. – С. 30.
 13. Саватеева, Е.А. Серосодержащие гетероциклические соединения с потенциальной противодиабетической активностью / Е.А. Саватеева, В.В. Емельянов, А.В. Мусальникова, Л.П. Сидорова, Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, В.А. Черешнев // *Chimica Techno Acta*. – 2014. – V.1, №3. – С. 83 – 86.

Используемые сокращения

1,3,4-ТД – 1,3,4-тиадиазин

2-Г-4-ПТ – 2-гуанидин-4-пиридинтиазол

G-SH – глутатион восстановленный

G-SS-G – глутатион окисленный

HbA_{1c} – гликозилированный гемоглобин

RAGE – рецептор конечных продуктов гликозилирования

АК – аскорбиновая кислота

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГИЧ – генноинженерный инсулин человека

КПГ – конечные продукты гликозилирования

ЛК – липоевая кислота

МДА – малоновый диальдегид

НГБ – неферментативное гликозилирование белка

СД – сахарный диабет

СРО – свободнорадикальное окисление

ФА – фруктозамин